

Trp-kalitka minifehérjék szerkezet-, dinamika- és feltekeredésvizsgálata

Doktori értekezés tézisei



ROVÓ PETRA

Témavezető: Dr. Perczel András, D. Sc

Kémia Doktori Iskola

Iskolavezető: Dr. Inzelt György, D. Sc

Szintetikus kémia, anyagtudomány, biomolekuláris kémia
doktori program

Programvezető: Dr. Perczel András, D. Sc

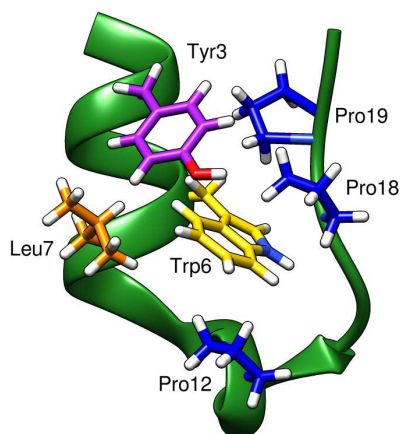
Eötvös Loránd Tudományegyetem
Természettudományi Kar, Kémia Intézet
Szerkezeti Kémia és Biológia Laboratórium

2014

Bevezető

A mindössze 20 aminosavból felépülő, *de novo* tervezett Trp-kalitka minifehérje már számos *in vitro* és *in silico* vizsgálat tárgyát képezte. Jelen doktori munka ennek a model fehérjecsaládnak a szerkezeti, dinamikai és feltekeredési útvonalának tanulmányozásával foglalkozik.

A Trp-kalitka kiváló fehérje model, hiszen a kis méretének köszönhetően jóval kisebb az a paramétertér, amely a fehérje fiziko-kémiai jellemzőit meghatározza. Habár a Trp-kalitka kicsi, minden egyéb tulajdonságában a nagyobb fehérjékre emlékeztet: fiziológiás körülmények között is jól-definiált, permanens háromdimenziós szerkezete van; kooperatív feltekeredési profilt mutat egy látszólagos 40 – 50 °C fokos olvadási hőmérséklettel; és a feltekeredését ugyanolyan szabályok vezérlik, mint a nagyobb, egy doménből álló globuláris fehérjék feltekeredését.



1. ábra. A Trp-kalitka minifehérje szerkezetének szalagmodelje (PDB: 1L2Y).

A Trp-kalitka tanulmányozása az elméleti szinten túl gyakorlati jelentőséggel is bír, ugyanis a 39 aminosav hosszú polipeptid, amelyből eredetileg ezt a minifehérjét származtatták az egy a kettéstípusú cukorbetegség kezelésében használt gyógyszer. Az optimált Trp-kalitka szekvenciát alkalmazva lehetőség nyílik a gyógyszer fizikai-kémiai tulajdonságainak javítására.

Célkitűzések

Doktori munkám célja a Trp-kalitka fehérjecsald szerkezetének, dinamikájának és feltekeredési útvonalának *in vitro* vizsgálata homo- és heteronukleáris NMR spektroszkópia segítségével.

Munkám során három Trp-kaltika csoportot vizsgáltam.

1. Az első csoport az Asp⁹ – Arg¹⁶ sóhíd variánsai voltak, melyek vizsgálatával arra kerestem a választ, hogy egy közepesen erős elektrosztatikus kölcsönhatás milyen mértékben befolyásolja a minifehérje stabilitását, és hogy az abban résztvevő két aminosav oldallánca milyen más háttérkölcsönhatásokban vesz részt. Két féle módszerrel gyengítettem a sóhíd vonzó erejét, egyfelől Asp → Asn, Ser és Arg → Ala mutációkkal szüntettem meg az egyik vagy másik sóhíd alkotó töltését, másfelől alacsony pH-t alkalmazva a karboxil csoport protonálásával csökkentettem a sóhíd elektrosztatikus jellegét.
2. Vizsgálódásaim második csoportját a szerin illetve foszfoszerin variánsok jelentették. A Trp-kalitkában három szerin található – Ser¹³, Ser¹⁴ és Ser²⁰ – melyek mindegyikét glutaminra illetve glutamátra cseréltünk és összehasonlítottuk ezen variánsok szerkezeti és stabilitási tulajdonságait az ugyanezen pozíciókban foszfoszerin aminosavat tartalmazó petidek tulajdonságaival. Biológia tanulmányok során glutamát vagy aszpartát helyettesítést előszeretettel alkalmaznak arra, hogy foszfoszerin vagy foszfotreonin oldalláncokat mimikáljanak. Mi ezzel az összehasonlító vizsgáltunkkal azt szerettük volna felmérni, hogy ez a foszfoaminosav mimikri mennyiben állja meg a helyét, valóban hasonló fiziko-kémiai paraméterekkel jellemezhető-e a két rendszer.
3. A harmadik Trp-kalitka csoportot az N-terminálisán meghosszabbított variánsok képezték. A hosszabbításhoz az Exendin-4, antidiabetikus peptid-gyógyszer α -hélixét alkotó aminosavait használtuk. Ennek a munkának a végső célja az volt, hogy egy olyan minifehérjéhez jussunk, amelyik vizes közegben is teljes

mértékben oldódik, jól-meghatározott szerkezete van, és dinamikai illetve kötődési tulajdonságaiban minél jobban emlékeztet a kettes típusú diabétesz kezelésére használt Exendin-4 peptid ezen jellemzőire.

Ezen három minifehérje család jellemzésére különböző NMR spektroszkópai módszereket alkalmaztam.

1. Homonukleáris TOCSY, COSY és NOESY spektrumok segítségével információt gyűjtöttem a minifehérjék relatív stabilitásáról. Ehhez a Trp-kalitkákra jellemző másodlagos kémiai eltolódásokat vettem alapul. A kémiai eltolódások összehasonlításával már nagyon kismértékű stabilitásváltozás egyértelműen detektálható, így összetettebb hőmérsékletfüggő vagy kalorimetriás mérések hiányában is egyértelműen meghatározható, hogy mely variáns a legstabilabb, és melyek a kevésbé stabil formák. Ezzel a módszerrel a doktori munkámban felsorolt minden minifehérjét megvizsgáltam.
2. Abban az esetben, amikor az adott Trp-kalitka variáns NOESY spektrumából kellő számú távolságjellegű kényszerfeltétel kigyűjtésére volt mód, akkor ezek alapján harmadlagos szerkezetet (szerkezet-sokaságot) számoltam egy molekuladinamikai program segítségével. A szerkezet sokaságokat a gerinc és az oldal-lánc atomok átlagos négyzetes eltéréssel jellemeztem. Összesen 26 Trp-kalitka variáns szerkezetét határoztam meg ezzel a módszerrel.
3. Az általam vizsgált minták egy részét rekombináns technikával ^{15}N jelölt formában is elkészítettem¹. A ^{15}N jelölés lehetőséget adott heteronukleáris mérések elvégzésére. Kilenc minta készült ilyen formában, melyek mindegyikéről készült hőmérséklet-függő HSQC mérés (heteronuclear single-quantum coherence spectroscopy) illetve ^{15}N R_1 , R_2 és heteronukleáris NOE relaxációs mérés. A hőmérséklet-függő mérésekkel a minifehérjék feltekeredési útvonalát kívántam jellemezni, míg a relaxációs mérésekkel a minifehérjék gerincének ps-ns időskálájú mozgékonyaságáról gyűjtöttem információt.

¹A homonukleáris mérésekhez használt mintákat szilárd fázisú peptidszintézissel a Szegedi Tudományegyetem Orvosvegytani Intézetének munkatársai készítették.

Módszerek

Az általam vizsgált nemjelölt peptidek jelentős részét a Szegedi Tudományegyetem Orvosi Vegytani Intézetében Tóth Gábor professzor úr diákjai készítették szilárd-fázisú peptidszintézissel. A nemjelölt minták többi része, illetve a ^{15}N és ^{13}C , ^{15}N jelölt minták rekombináns technikával készültek *E. coli* gazdasejtekben ubikvitin fúziós rendszert használva. Az expresszióval készített mintákat Ni-affinitás kromatográfiával és fordított fázisú HPLC kromatográfiával tisztítottuk, minőségi analízisére tömegspektromterias méréseket végeztünk.

A dolgozatban bemutatott ECD spektrumok egy Jasco J810 típusú dikrográfon készültek 185 – 260 nm hullámhossz tartományban. A minták NMR spektrumai Bruker DRX 500 és 700 MHz-es spektrométeren készültek 5 mm-es háromcsatornás mérőfej segítségével. Az NMR minták fehérjekoncentrációja 0.5 – 1.5 mM között változott, oldószerként 10% D_2O :90% H_2O -t vagy 30% deuterált trifluoroetanol:70% H_2O elegyet alkalmaztam. Belső protonreferenciának a 4,4-dimetil-4-szilapentán-1-szulfonsav (DSS) metil jelét használtam, és értékét minden esetben 0.0 ppm-re állítottam. A másodlagos kémiai eltolódást a mért kémiaieltolódás és a random-coil referencia kémiai eltolódás különbségeként adtam meg.

A homonukleáris spektrumok asszignációját a TOCSY, COSY és NOESY spektrumok alapján végeztem el. A szerkezetszámításhoz a NOESY spektrumokból származtatott távolsággal arányos NOE jelek intenzitását vettem alapul. A heteronukleáris spektrumokat 3D HSQC-TOCSY, HSQC-NOESY illetve HNCA, HNCOC, HNCACB és CCONH spektrumok segítségével asszignáltam. A ^{15}N gerinc relaxációs méréseket (R_1 , R_2 , $R_{1\rho}$ és NOE) ismert pulzusszekvenciákat használva mértem. Kiértékelésükre a Lipari-Szabo modellfüggetlen formalizmust illetve a Redukált Spektrális Sűrűség térképezést használtam. A hőmérsékletfüggő spektrumok analíziséhez egy dekonvolúciós eljárást dolgoztam ki, amellyel mind a tiszta állapotok kémiai eltolódásai, mind az átalakulás lépéseinek termodinamikai paraméterei illeszthetőek voltak.

Tézisek

A Trp-kalitka sóhíd variánsainak tanulmányozása segített abban, hogy megértsem, milyen szerepe van egy gyenge elektrosztatikus kölcsönhatásnak a minifehérje szerekeztének és stabilitásának kialakításában.

1. Úgy találtam, hogy az Arg¹⁶ oldalláncnak nagyobb szerkezetstabilizáló szerepe van, mint az Asp⁹ oldalláncnak, ugyanis az arginin egyszerre képez sóhidat, illetve védi a hidrofób magot.
2. A gerinc mozgékonyásra vonatkozó méréseim azt mutatták, hogy az Asp⁹ → Asn⁹ mutáció nem befolyásolja jelentősen a minifehérje dinamikáját, ellenben az Asp⁹ → Ser⁹ oldallánc csere nagy mozgási szabadságot ad a molekula C-terminális részének.

Azon minifehérjék szerkezeti tanulmányozása, melyeknél az egyik szerin glutaminsavra, glutaminra vagy foszfo-szerin csoportra lett cserélve segített annak megértésében, hogy milyen körülmények között lehet a glutaminsav mimikrit használni foszfo-szerin aminosavak helyettesítésére.

1. Ezek a mérések rávilágított arra, hogy a 14-dik pozíciójú szerin szerkezeti-
leg igen jelentős, hiszen a hidroxil csoportjának az oxigénje és a hidrogénje is hidrogén-hidak kialakításában vesz részt, így már a szerin → glutaminsav/glutamin mutáció is nagymértékű destabilizációval jár.
2. A 13-dik pozícióban törénő mutációt a szerkezet jól tolerálja, mind az S13Q, mind pedig az S13E variáns stabilitása az eredeti Trp-kalitka molekulájával összemérhető. Nem várt eredmény, hogy a Ser¹³ → Glu¹³ mutáció egy alternatív konformer kialakulását idézi elő, amelyben a Trp⁶ – Pro¹² – Pro¹⁸ aminosavak egy elcsavarodott pozíciót vesznek fel, de a többi szerkezeti elem az az eredeti Trp-kalitka szerkezetével összemérhető.
3. Megállapítottam, hogy a Ser²⁰ oldalláncot is destabilizáció nélkül lehet hosszabb oldalláncú aminosavra cserélni, sőt, ebben az esetben a Ser → Glu mutáció sta-

bilitásnövekedéssel jár, a foszfo-szerin mutáció viszont már itt is teljes destabilizációt jelent. Ennek kapcsán a foszfo-szerin/glutamát mimikriáról kijelenthetem, hogy marginálisan stabil rendszereknél ez a helyettesítés nem alkalmazható, mert a két oldallánc mérete és töltése jelentősen eltér egymástól, és akár ellentétes hatást is gyakorol a fehérje szerkezetére és stabilitására.

4. A szerin variánsok kapcsán felfedeztem egy új, vonzó, szerkezetstabilizáló kölcsönhatást, amely egy negatívan töltött karboxil-csoport (jelen esetben Glu²⁰) és egy aromás gyűrű oldalának (Tyr³) parciálisan pozitív töltése között jön létre. A későbbiekben ezt az anion-aromás kölcsönhatást a csoportom egyik munkatársával együttműködve kvantumkémiai számításokkal kívánjuk elemezni.

Az N-terminálison meghosszabbított variásokkal közelebb kerültem ahhoz, hogy megértsem a kapcsolatot a Trp-kalitka minifehérjék szerkezete, dinamikája és feltekeredési útvonala között. Ezen minták tanulmányozása alapot szolgáltatnak az Exendin-4 antidiabetikum racionális átszabásához.

1. Egy N-terminális Asn \rightarrow Arg mutáció jelentősen rontott a fehérje stabilitásán, viszont a további hélix-hosszabbítással a molekula stabilitása helyre állt, az 25 aminosav hosszú Trp-kalitka variáns már ugyanolyan stabilitású, mint a kiindulási 20 aminosavas molekula.
2. A vizsgálatok során úgy találtuk, hogy a minifehérje α -hélixének C-terminális fele stabilabb és kevésbé mozgékony, mint az N-terminális szakasza, ugyanis az előbbi PPII régió védi míg az utóbbi egy szabad α -hélix.
3. A 39-aminosav hosszú Exendin-4 analóg Trp-kalitka variáns (E19) szerkezetében és dinamikai tulajdonságaiban nagyon hasonlít az Exendin-4 30% trifluoroetanolban mért tulajdonságaihoz. Azonos közegben összehasonlítva az E19 molekula 20 – 30%-ban helikálisabb az Exendin-4-nél, aggregációra, oligomerizációra kevésbé hajlamos, és ezen felül biológiai aktivitása az Exendin-4 molekulájával összemérhető.

Hőmérsékletfüggő NMR spektroszkópiai mérésekkel jellemeztem a Trp-kalitka minifehérjék feltekeredésének útvonalát.

1. Megállapítottam, hogy a Trp-kalitka feltekeredése nem egy egyszerű kétállapotú folyamat, amelyben csak a rendezett és a rendezetlen állapot van jelen, hanem közegetől függően egy vagy több rendezett vagy közel rendezetlen intermedier állapot alakul ki.

-
2. A HSQC spektrumok elemzésére egy Bezier görbeillesztésen alapuló módszert használtam, és ennek segítségével egyértelműen jellemezni tudtam, hogy a hőmérsékletfüggő jelváltozás milyen mértékben tér el a két-állapotú átlakuláshoz rendelhető lineáris trendtől, vagyis mennyire görbe az észlelt keresztcsúcs elolódás változása.
 3. Kvantitatív elemzés céljából elvégeztem a ^{13}C , ^{15}N jelölt Tc5b minta hőmérsékletfüggő ^{13}C és ^{15}N HSQC spektrumainak termodinamikai illesztését. Egy nemlináris iteratív függvényillesztést dolgoztam ki, amivel mind a több-lépéses folyamat termodinamikai paramétereit ($\Delta H^{\text{F-I}}$, $T_m^{\text{F-I}}$, $\Delta C_p^{\text{F-I}}$ és $\Delta H^{\text{I-U}}$, $T_m^{\text{I-U}}$, $\Delta C_p^{\text{I-U}}$) mind pedig a tiszta állapotainak NMR kémiai eltoldódásait származtatni tudtam.
 4. A tiszta állapotok kémiai eltoldódásainak segítségével jó közelítéssel becslést adtam az intermedier szerkezetéről, és megállapítottam, hogy az a Gly¹⁰ – Gly¹⁵-ös szakaszban lejátszódó $3_{10} \rightleftharpoons \alpha$ -hélix átrendeződésnek az eredménye.
 5. A savas közegben mért T -függő mérésekkel detektáltam egy olyan alternatív intermedier állapotot (U'), amely a fő konformerekkel (folded, intermedier és unfolded) az NMR időskálán nézve lassú cserében áll. Ez a forma jeltősen rendezetlen, és a Gly¹¹ – Pro¹²-es peptid kötése mind *cisz* mind *transz* konformációt is felvehet.
 6. Elvégeztem a sóhíd variáns és N-terminálison hosszabbított variáns minták hőmérsékletfüggő méréseinek kvalitatív elemzését. Megállapítottam, hogy az összetett, több-lépéses feltekeredési útvonal univerzális a minifehérje családban. A görbületek elemzésével megállapítottam, hogy a gyorsan cserélő intermedier állapot populációja nagyobb azokban a mintákban, amelyeket Asp⁹ – Arg¹⁶ vagy Glu⁹ – Arg¹⁶ sóhíd stabilizál. Ebből arra következtettem, hogy ez az intermedier egy úgy nevezett on-pathway intermedier, vagyis a feltekeredés során a folded és az unfolded állapotok között helyezkedik el.

Következtetések

A Trp-kalitka minifehérjének tanulmányozása rámutatott arra, hogy milyen keskeny a határmezsgye egy fehérje rendezett és rendezetlen állapota között, csupán egyetlen sóhíd vagy H-híd megváltoztatása képes teljes mértékben felborítani a finom konformációs egyensúlyt. Ennek tükrében még nagyobb hangsúlyt kell a jövőben fektetni arra, hogy a fehérjék stabilizálásban résztvevő gyenge kölcsönhatások energiáját illetve a kölcsönható csoportok geometriai preferenciáit tanulmányozzuk, az azokat létrehozó erőket megértsük. A számítógépes kémia fejlődésével szerencsére egyre nagyobb rendszerekről tudunk majd egyre pontosabb kölcsönhatási energiát számítani, ami a jövőben megkönnyítheti a kísérletes kémiában születő mérések eredményeinek az értelmezését, és alapot szolgáltathatnak raionális fehérje tervezésére.

Egy másik fontos aspektus, amire a vizsgáltaink rávilágítottak az az, hogy egy ilyen kisméretű fehérje is milyen összetett feltekeredési profillal rendelkezik. Ennek kapcsán felvetődik a kérdés, hogy milyen mértékben állja meg a helyét globuláris fehérjék feltekeredési leírására használt két vagy három állapotú modell, vajon mennyi, milyen szerkezetű és mekkora populációval rendelkező intermedier állapot jelenik meg a fehérjék rendeződése során. A méréseim alapján a véleményem az, hogy nagyobb fehérjéknél is számos intermedier létezik egyszerre egyensúlyban a natív konformációval, de ezek egyrészt szerkezetüket tekintve nem különböznek jelentősen a fő konformer-től, másfelől egyéni populációjuk kicsi, ezért még a legérzékenyebb módszerekkel is nehezen lehet ezen állapotokat detektálni. Mivel a Trp-kalitikában relatíve kevés intermedier állapot tud kialakulni, amely viszont nagy populációban jelenik meg, ezért azt egy egyszerű NMR méréssel megfigyelni, majd pedig jellemezni tudtuk.

Az a tény, hogy egy model fehérje segítségével képesek vagyunk az atomi szintű szerkezetben, a gerinc dinamikában illetve a feltekeredési útvonalban finom különbségek detektálására, kiváló lehetőséget ad arra, hogy pontosabb képet alkossunk a fehérjék feltekeredésének potenciális energiafelületéről. Az általunk bemutatott kísérleti eredmények további *in silico* szimulációkhoz szolgáltatnak értékes adatsorokat.

Közlemények

A dolgozat témájában megjelent, illetve közlés alatt álló publikációk

1. **Structural Insights into the Trp-Cage Folding Intermediate Formation**

Petra Rovó, Pál Stráner, András Láng, István Bartha, Kristóf Huszár, László Nyitrai and András Perczel

Chem. Eur. J., **2013**, 19: 2628-2640. doi: 10.1002/chem.201203764, **IF**: 5.831

2. **Cooperativity network of Trp-cage miniproteins: Probing salt-bridges**

Petra Rovó, Viktor Farkas, Orsolya Hegyi, Orsolya Szolomájer-Csikós, Gábor K. Tóth and András Perczel

J. Peptid Sci., **2011**, 17: 610-619 doi: 10.1002/psc.1377, **IF**: 1.799

3. **Rational design of α -helix stabilized Exendin-4 analogues**

Petra Rovó, Viktor Farkas, Pál Stráner, Ágnes Jermendy, Orsolya Hegyi, Gábor Tóth, András Perczel

Biochemistry, **2014**, beküldött kézirat

4. **Phosphorylation as conformational switch to amyloid state: Trp-cage as protein aggregation model**

József Kardos, Bence Kiss, András Micsonai, János Kovács, Petra Rovó, Györgyi Váradi, Gábor Tóth, András Perczel

beküldés alatt